



**PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET**

**Intyg
Certificate**

Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.

(71) Sökande Kurt G I Nilsson, Lund SE
Applicant (s) Carl-Fredrik Mandenius, Huddinge SE

(21) Patentansökningsnummer 9301270-6
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1993-04-17
Date of filing

Stockholm, 1994-04-22

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office

Asa Dahlberg
Asa Dahlberg

Avgift
Fee

PRIORITY DOCUMENT

1993-01-17

BIOSENSOR

Föreliggande uppfinning hänför sig till en biosensor i vilken en kolhydrat eller ett derivat därav används för att via specifik inbindning av ett protein, ett virus eller en cell generera en detekterbar signal.

Bakgrund

Biosensorer karakteriseras av fysikalisk eller kemisk mätgivare (signalöverförare) vars respons aktiveras av en specifik interaktion mellan en biokemisk struktur (som direkt eller indirekt bundits till mätgivaren) och en eller flera analyter.

Biosensorer används för att påvisa analyten/er och i vissa fall även för att kvantifiera analyten/er.

Biosensors fördelar utgörs av att en fysikalisk eller kemisk mätgivare mha den bundna biokemiska strukturen tilldelats specificitet så att en allmän fysikalisk eller kemisk parameter (t.ex. temperatur, pH, optisk täthet) kan utnyttjas för att detektera en enda substans i en komplex blandning av icke-specifika substanser.

Biosensors begränsningar utgörs av den biokemiska strukturens specificitet, specificitetsbredd och stabilitet, samt av att mätgivaren måste göras oberoende av mätmediets bakgrundsförändring i den parameter givaren mäter. I Methods of Enzymology, volym 137, beskrivs i ett antal artiklar olika aspekter av biosensorer.

Definitioner:

Biosensor - fysikalisk eller kemisk signalöverförare, t.ex. fotometer, kemisk elektrod, temperaturgivare, tryckgivare, som direkt eller indirekt förenats med en biokemisk struktur. Som biokemisk struktur har i tidigare kända biosensorer utnyttjats företrädesvis enzym, specifikt protein, antikropp och därmed har biosensors bibringats egenskapen att kunna påvisa substanser som specifikt binder den biokemiska strukturen i kvalitativa eller kvantitativa mått.

Reflektansmätning - mätning av intensiteten hos ljus reflekterat från en yta där ytans egenskaper påverkar reflektansen, t.ex. biomolekyler som ändrar ytans brytningsindex.

Polarisationsmätning - mätning av polariserat ljus polarisationstillstånd, vanligen polarisationsvinkel, beroende av biomolekyler, virus eller cellers inbindning.

Ytplasmonspektroskopi - optisk fysikalisk mätteknik som utnyttjar tunna metallgränsskikt s.k. ytplasmontillstånd, för att med stor känslighet påvisa förändringar i brytningsindex, t.ex. orsakad av biomolekyler närvaro i gränsskiktet.

Ellipsometri - optisk fysikalisk mätteknik som med stor känslighet påvisar förändringar i brytningsindex vid gränsskikt genom att mäta förändringar i ellipticitet hos polariserat ljus, t.ex. orsakad av biomolekyler närvaro i gränsskiktet.

Piezoelektrisk kristall - kristall vars egensvängningsfrekvens kan påverkas av massändring eller tryckändring och som kan registreras elektriskt, t.ex. massändring åstadkommen av biomolekyl(er), virus eller cell(er) som bundit till kristallytan.

Elektrokemisk elektrod - mätgivare som genererar en elektrisk signal pga en elektrokemisk reaktion vid elektroden som är relaterad till en kemisk parameter, t.ex. pH, pO_2 , pCO_2 , vilkas värden kan variera beroende på förekomst av analyt(er) i ett prov specifika för ett ämne bundet till mätgivaren.

Termistor - elektrisk resistansmätare som ändrar ledningsförmåga med temperaturen; biokemiska reaktioner är bl.a. karakteriserade av specifika värden på värmeupptag/utveckling, vilka således kan registreras via termistorer.

Ett stort antal av de kolhydratsekvenser som förekommer i glykoproteiner eller i glykolipider, och vanligen också mindre fragment av dessa sekvenser, uppvisar biospecifik bindning till proteiner, virus eller celler.

Föreliggande uppfinning beskriver en biosensor där denna specificitet utnyttjas för analys/bestämning av sådan komponent i ett prov. Uppfinningen karakteriseras av att kolhydraten eller ett derivat därav bundits till en yta i biosensorn.

Som kolhydrat används vanligen fragment (oligosackarider) av de kolhydratsekvenser som förekommer i glykoproteiner eller i glykolipider och vanligen används mindre fragment av dessa sekvenser, dvs disackarid, trisackarid, tetrasackarid eller pentasackarid, eftersom denna storlek ofta är fullt tillräcklig för att oligosackariden skall uppvisa biospecifik bindning av ett protein, ett virus eller en cell. En redogörelse för olika sådana kolhydratsekvenser återfinns bl.a. i Chemistry and Physics of Lipids, vol. 42, sid. 153-172, 1986 och i Ann. Rev. Biochem. vol. 58, sid. 309-50, 1989.

Vanligen är oligosackariden modifierad i den reducerande änden med en s.k. aglykon, vilken utgörs av en glykosidiskt bunden organisk grupp som lämpar sig för inbindning till ytan i biosensorn. Exempel på aglykoner är $-OEtSEtCONHNH_2$, $-OEtPhNH_2$, etc. Inbindningen kan ske till ytan i biosensorn direkt eller via ett protein som t.ex. bovint serum albumin eller via en kemisk struktur som adsorberats eller kovalent bundits till ytan. En sådan kemisk struktur kan innehålla reaktiva organiska grupper såsom exempelvis karboxyl-, sulfonat, cyanat-, epoxi-, aldehydgrupper eller andra grupper lämpliga för kemisk konjugering med t.ex. en amin eller tiol grupp i aglykonen.

Mer specifika exempel på analyter vilka kan analyseras med biosensor enligt föreliggande uppfinning är lektiner, antikroppar mot kolhydrater, patogena virus eller bakterier som exempelvis urinvägsbakterier (exempelvis P-fimbrierad E. coli) eller luftvägspatogener, samt bakterier som orsakar infektioner/diarreer i tarmkanalen.

Biosensorn enligt uppfinningen kan vara utformad i ett stort antal möjliga konfigurationer. Exempel härpå är:

a) plan kolhydrat-yta som med lätthet kan kontaktas med provvätska, exempelvis en yta utformad som en sticka, varpå ytan kan placeras i mätinstrument för optisk reflektansmätning i luft

3.

b) flödessystem med provgenomflödescell vars ytor förenats med kolhydrat och där signalöverföring görs med optisk, elektrokemisk, termisk eller gravimetrisk mätmetod och där mätgivaren är placerad i eller nära anslutning till cellen.

c) mätbehållare, kyvettmodell, som förenats med signalöverförande givare med kolhydrat till vilken mätvätskan tillförs.

d) plan kolhydratyta som ytgörs av en del av signalöverföraren som med lätthet kan bringas i kontakt med provvätska under lämpligt tidsintervall, varefter provvätskan avlägsnas och signalöverförarytan karakteriseras med fysikalisk mätmetod, t.ex. elektronisk mätning, gravimetrisk mätning eller termisk mätning.

I några situationer, t.ex. för att öka biosensorsignalen vid mätning av låga koncentrationer av celler, kan det vid mätning av analyt med biosensorn vara fördelaktigt att efter inbindning av analyt till kolhydratyten tillsätta mikropartiklar försedda med exempelvis kolhydrat som binder till den bundna cellen.

Ytan i biosensorn kan utgöras av exempelvis en guldyta eller en modifierad guldyta, plastyta som belagts med en guldyta, silveryta eller en annan metallyta eller modifieringar därav med polymerer till vilka kemisk koppling av kolhydrat kan ske.

Nedan ges icke-begränsande exempel på kolhydratyta som kan utnyttjas i biosensor enligt uppfinningen för inbindning och analys/bestämning av patogena urinvägsbakterier.

EXEMPEL

Ett exempel utfördes som följer: Kiselyta belagd med ett guldskikt modifierades med merkaptopropionsyra genom att nedsänka ytan i en 5 mM lösning av syran. Karboxylgrupperna modifierades med karbodiimid (EDC) under 2 timmar varpå digalaktosid med aglykon ($\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta\text{-OEtSEtCONHNH}_2$), kopplades till den EDC-aktiverade ytan under 12 timmar vid pH 8.5 och ytan sköljdes därefter med buffert.

Den så med digalaktosid modifierade guldytan nedsänktes under 60 minuter (denna tid kan varieras) i ett prov med urinvägsinfektionsbakterier (s.k. p-fimbrierade E.coli) med $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -specifikt receptorprotein, varefter ytan sköljdes med destillerat vatten i 2 minuter.

En annan guldyta derivatiserad p.s.s. med $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ nedsänktes i ett prov innehållande en annan icke-infektionsframkallande E. coli stam som saknar $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -specifikt receptorprotein. Inbindningsgraden av olika bakterier jämfördes mellan ytorna mha elektronmikroskop. Bakterien med $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -receptor band in i ett 10-15 faldigt överskott jämfört med den andra bakterien.

Inbindningen av p-fimbrierade E.coli till en guldyta modifierad med enbart merkaptopropionsyra var ca 20 ggr lägre än till den $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -modifierade ytan.

4.

PATENTKRAV

1. Biosensor, kännetecknad av att minst en kolhydrat eller ett derivat därav med förmåga att binda ett protein, ett virus eller en cell är kovalent bunden till en yta i biosensorn.
2. Biosensor enligt krav 1, kännetecknad av att kolhydraten är kemiskt bunden till en yta som utgör en del av biosensorns signalöverföringsdel.
3. Biosensor enligt krav 1, där biosensorn är en optisk biosensor som ger en signaländring vid inbindning av ett protein, ett virus eller en cell till en yta i biosensorn.
4. Biosensor enligt krav 3, där den optiska biosensorn utnyttjar ytplasmonstillståndsförändringar, ellipsometri, reflektansmätning eller polarisationsmätning.
5. Biosensor enligt krav 1, där biosensorn är baserad på en piezoelektrisk kristall, elektrokemisk elektrod eller en termistor.
6. Biosensor enligt krav 1, där kolhydraten är en oligosackarid eller ett derivat därav som bundits via en aglykon till en yta i biosensorn.
7. Biosensor enligt krav 1, där kolhydraten är en oligosackarid eller ett derivat därav som bundits via en guldtyta till en guldtyta i biosensorn.
8. Metod att binda ett kolhydrat eller ett derivat därav till en guldtyta, karakteriserat av att ytan först täcks av en tiolförening som innehåller en organisk grupp som kan utnyttjas för kemisk bindning av ett kolhydrat eller ett derivat därav.
9. Guldtyta modifierad med kolhydrat eller ett derivat därav.
10. Användning av biosensor enligt krav 1 för bestämning och eller analys av ett protein, ett virus, eller en cell.

SAMMANFATTNING

Föreliggande uppfinning hänför sig till en biosensor i vilken en kolhydrat eller ett derivat därav används för att via specifik inbindning av ett protein, ett virus eller en cell generera en detekterbar signal.

Record copy
PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only	
International Application No.	PCT/ SE 94 / 00343
International Filing Date	18 -04- 1994
The Swedish Patent Office PCT International Application	
Name of receiving Office and "PCT International Application"	
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum)	

Box No. I TITLE OF INVENTION

BIOSENSOR

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Kurt Nilsson
Andjaktsv. 6
S-226 53 Lund
Sweden

☒ This person is also inventor.

Telephone No.

Int+46-46 304179

Facsimile No.

Int+46-46 185781

Teleprinter No.

State (i.e. country) of nationality:

Sweden

State (i.e. country) of residence:

Sweden

This person is applicant for the purposes of:

☒ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Carl-Fredrik Mandenius
Strömkarlsv. 36
141 42 Huddinge
Sweden

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

Sweden

State (i.e. country) of residence:

Sweden

This person is applicant for the purposes of:

☒ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

State (i.e. country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☐ agent

☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

Telephone No.

Fascimile No.

Teleprinter No.

☐ Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☐ **OA OAPI Patent:** Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Chad, Congo, Côte d'Ivoire, Gabon, Guinea, Mali, Mauritania, Niger, Senegal, Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> NL Netherlands |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LU Luxembourg | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) of
 The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY		Further priority claims are indicated in the Supplemental Box <input type="checkbox"/>	
The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:			
Country (in which, or for which, the application was filed)	Filing Date (day/month/year)	Application No.	Office of filing (only for regional or international application)
item (1) Sweden	19 April 1993 (19.04.1993)	9301270-6	
item (2)			
item (3)			

Mark the following check-box if the certified copy of the earlier application is to be issued by the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office (a fee may be required):

☒ The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s) : (1)

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / Se

Earlier search Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been carried out or requested and the Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of that earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request:

Country (or regional Office): Date (day/month/year): Number:


Box No. VIII CHECK LIST


This international application contains the following number of sheets: 1. request : 3 sheets 2. description : 6 sheets 3. claims : 2 sheets 4. abstract : 1 sheets 5. drawings : sheets Total : 12 sheets	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 2. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney 3. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 4. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 5. <input type="checkbox"/> fee calculation sheet 6. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganisms 7. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing (diskette) 8. <input type="checkbox"/> other (specify):
--	--

Figure No. _____ of the drawings (if any) should accompany the abstract when it is published.

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).


 Kurt Nilsson


 Carl-Fredrik Mandenius

For receiving Office use only		2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input checked="" type="checkbox"/> not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:	18 -04- 1994	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority specified by the applicant: ISA / SE	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	24 MAY 1994 (24.05.94)

Föreliggande uppfinning hänför sig till en biosensor i vilken en kolhydrat eller ett derivat därav används för att via specifik inbindning av ett protein, ett virus eller en cell generera en detekterbar signal.

Bakgrund.

Biosensorer karakteriseras av fysikalisk eller kemisk mätgivare (signalöverförare) vars respons aktiveras av en specifik interaktion mellan en biokemisk struktur (som direkt eller indirekt bundits till mätgivaren) och en eller flera analyter.

Biosensorer används för att påvisa analyten/er och i vissa fall även för att kvantifiera analyten/er.

Biosensors fördelar utgörs av att en fysikalisk eller kemisk mätgivare mha den bundna biokemiska strukturen tilldelats specificitet så att en allmän fysikalisk eller kemisk parameter (t.ex. temperatur, pH, optisk täthet) kan utnyttjas för att detektera en enda substans i en komplex blandning av icke-specifika substanser.

Biosensors begränsningar utgörs av den biokemiska strukturens specificitet, specificitetsbredd och stabilitet, samt av att mätgivaren måste göras oberoende av mätmediets bakgrundsförändring i den parameter givaren mäter. I Methods of Enzymology, volym 137, beskrivs i ett antal artiklar olika aspekter av biosensorer.

Definitioner:

Biosensor - fysikalisk eller kemisk signalöverförare, t.ex. fotometer, kemisk elektrod, temperaturgivare, tryckgivare, som direkt eller indirekt förenats med en biokemisk struktur. Som biokemisk struktur har i tidigare kända biosensorer utnyttjats företrädesvis enzym, specifikt protein, antikropp och därmed har biosensors bibringats egenskapen att kunna påvisa substanser som specifikt binder den biokemiska strukturen i kvalitativa eller kvantitativa mått.

Reflektansmätning - mätning av intensiteten hos ljus reflekterat från en yta där ytans egenskaper påverkar reflektansen, t.ex. biomolekyler som ändrar ytans brytningsindex.

Polarisationsmätning - mätning av polariserat ljus polarisationstillstånd, vanligen polarisationsvinkel, beroende av biomolekyler, virus eller cellers inbindning.

Ytplasmonspektroskopi - optisk fysikalisk mätteknik som utnyttjar tunna metallgränsskiktets s.k. ytplasmontillstånd, för att med stor känslighet påvisa förändringar i brytningsindex, t.ex. orsakad av biomolekyler närvaro i gränsskiktet.

Ellipsometri - optisk fysikalisk mätteknik som med stor känslighet påvisar förändringar i brytningsindex vid gränsskikt genom att mäta förändringar i ellipticitet hos polariserat ljus, t.ex. orsakade av biomolekyler närvaro i gränsskiktet.

Piezoelektrisk kristall - kristall vars egensvängningsfrekvens kan påverkas av massändring eller tryckändring och som kan registreras elektriskt, t.ex. massändring åstadkommen av biomolekyl(er), virus eller cell(er) som bundit till kristallytan.

**CONFIRMATION
COPY**

2.

Elektrokemisk elektrod - mätgivare som genererar en elektrisk signal pga en elektrokemisk reaktion vid elektroden som är relaterad till en kemisk parameter, t.ex. pH, pO_2 , pCO_2 , vilkas värden kan variera beroende på förekomst av analyt(er) i ett prov specifika för ett ämne bundet till mätgivaren.

Termistor - elektrisk resistansmätare som ändrar ledningsförmåga med temperaturen; biokemiska reaktioner är bl.a. karakteriserade av specifika värden på värmeupptag/utveckling, vilka således kan registreras via termistorn.

Ett stort antal av de kolhydratsekvenser som förekommer i glykoproteiner eller i glykolipider, och vanligen också mindre fragment av dessa sekvenser, uppvisar biospecifik bindning till proteiner, virus eller celler.

Föreliggande uppfinning beskriver en biosensor där denna specificitet utnyttjas för analys/bestämning av sådan komponent i ett prov. Uppfinningen karakteriseras av att kolhydraten eller ett derivat därav bundits till en yta i biosensorn.

Som kolhydrat används vanligen fragment (oligosackarider) av de kolhydratsekvenser som förekommer i glykoproteiner eller i glykolipider och vanligen används mindre fragment av dessa sekvenser, dvs disackarid, trisackarid, tetrasackarid eller pentasackarid, eftersom denna storlek ofta är fullt tillräcklig för att oligosackariden skall uppvisa biospecifik bindning av ett protein, ett virus eller en cell. En redogörelse för olika sådana kolhydratsekvenser återfinns bl.a. i Chemistry and Physics of Lipids, vol. 42, sid. 153-172, 1986 och i Ann. Rev. Biochem. vol. 58, sid. 309-50, 1989.

Vanligen är oligosackariden modifierad i den reducerande änden med en s.k. aglykon, vilken utgörs av en glykosidiskt bunden organisk grupp som lämpar sig för inbindning till ytan i biosensorn. Exempel på aglykoner är $-OEtSEtCONHNH_2$, $-OEtPhNH_2$, etc. Inbindningen kan ske till ytan i biosensorn direkt eller via ett protein som t.ex. bovint serum albumin eller via en kemisk struktur som adsorberats eller kovalent bundits till ytan. En sådan kemisk struktur kan innehålla reaktiva organiska grupper såsom exempelvis karboxyl-, sulfonat, cyanat-, epoxi-, aldehydgrupper eller andra grupper lämpliga för kemisk konjugering med t.ex. en amin eller tiol grupp i aglykonen.

Mer specifika exempel på analyter vilka kan analyseras med biosensor enligt föreliggande uppfinning är lektiner, antikroppar mot kolhydrater, patogena virus eller bakterier som exempelvis urinvägsbakterier (exempelvis P-fimbrierad E. coli) eller luftvägspatogener, samt bakterier som orsakar infektioner/diarreer i tarmkanalen.

Ikke-begränsande exempel på kolhydratstrukturer av intresse och som kan användas i form av kolhydratderivat i biosensor enligt uppfinningen är monosackarider, disackarider, trisackarider och högre oligosackarider som uppvisar biologisk aktivitet eller har förmåga att specifikt binda en eller flera biomolekyler eller en grupp av biomolekyler. Exempel på biomolekyler är andra sackarider, peptider och proteiner. Exempel på dylika kolhydratsekvenser är blodgruppsdeterminanterna (exempelvis A, B, H, Lewis-a, Lewis-b, Lewis-x, Lewis-y), cancer-associerade kolhydratstrukturer, kolhydratsekvenser (ofta di-, tri- eller tetrasackarider) som binder till patogena bakterier/toxiner eller virus i t.ex. luftvägar, mag-/tarmkanal och urinvägar, kolhydratstrukturer som binder till proteiner/celler/vita blodkroppar associerade med inflammatoriska reaktioner (t.ex. vid selektin-kolhydratinteraktion).

Dessa och andra kolhydratstrukturer som kan förekomma i biosensor enligt föreliggande uppfinning innehåller ofta en eller flera följande monosackarider (eller ett derivat eller en analog av någon av dessa) och som är α - eller β -glykosidiskt bundna: hexosamin, fukos, mannos, glukos, N-acetyl-glukosamin, N-acetylgalaktosamin, xylos, galaktos, N-acetyl-galaktos eller en annan monosackarid. Dessa komponenter föreligger exempelvis i pyranosform eller i furanosform.

Exempel på kolhydratderivat är derivat där kolhydraten eller ett derivat eller en analog, är modifierad i sin reducerande ände med en O-, N-, C-, eller S-glykosidiskt bunden aglykon som kan vara ett alifatiskt eller ett aromatiskt ämne, en aminosyra-, peptid- eller proteinmolekyl och derivat därav. Aglykondelen kan således också utgöras av exempelvis ett O-, N-, C-, eller S-glykosidiskt bundet alifatiskt eller ett aromatiskt ämne som är bundet till en aminosyra-, peptid- eller proteinmolekyl och derivat därav. Exempel på kolhydratderivat som kan användas enligt uppfinningen är strukturer där en eller flera av hydroxylgrupperna i kolhydraten utöver eller istället för hydroxylgruppen i den reducerande änden av kolhydraten, modifierats med en organisk eller oorganisk grupp. Detta kan vara av intresse bl.a. för att öka/modifiera den biologiska aktiviteten eller för att underlätta bindningen till biosensorytan enligt uppfinningen.

Aglykondelen eller en annan grupp kan användas för adsorption eller kovalent bindning av kolhydratderivatet till ytan i biosensorn, samt kan utnyttjas i uppfinningen som spacermolekyl mellan biosensorytan och kolhydratdelen för att minimera steriska hinder vid inbindningen analyten till kolhydratdelen i biosensorn enligt uppfinningen

Det alifatiska eller aromatiska ämnet i aglykonen kan exempelvis bestå av strukturer av typen -R-X- där R- utgörs av ett organiskt ämne, exempelvis alkylkedja av typen $(-CH_2)_n-$

där n är ett heltal exempelvis i intervallet 2 till 8, eller utgörs av en aromatinnehållande struktur, och där -X är exempelvis en struktur av typen -S-, amid (-NH-CO- eller -CO-NH-), amin (-NH-), en -N=N- grupp eller annan grupp lämplig för bindning till ytan i biosensorn eller till ett protein (dvs i det senare fallet är kolhydratderivatet ett neoglykoprotein). Då kolhydratderivatet är ett neoglykoprotein kan R ovan utnyttjas som spacer mellan proteindelen och kolhydratdelen. Spacern har ofta en funktionell del (-X- ovan) som utnyttjats vid bindningen till proteinet.

Lämplig spacer och funktionell grupp väljs av fackmannen och begränsar inte uppfinningens omfattning.

Kolhydratderivatet kan också enligt uppfinningen utgöras av ett naturligt, in vitro framtaget glykoprotein eller ett rekombinant glykoprotein, eller en glykopeptid. Denna typ av derivat kan adsorberas till ytan i biosensorn, exempelvis en guld- eller kiselyta eller en annan yta som adsorberar proteiner, lipider, peptider.

Då kovalent bindning önskas kan man liksom vid det fall då kolhydratderivatet är ett neoglykoprotein, utnyttja exempelvis proteindelens amino-, karboxyl- eller tiol grupper för bindning till ytan i biosensorn. Detta (liksom syntes av neoglykoproteinet från kolhydrat-spacer och protein) kan ske med de standardtekniker som normalt används för modifiering av proteiner och för immobilisering av proteiner till bärare (se exempelvis metoder nämnda i Methods in Enzymology volymerna 44, 102 och 135) och valet av lämplig metodik avgörs av fackmannen i varje enskilt fall. Exempel på metodiker är koppling efter aktivering av karboxylgrupper med karbodiimidreagens, N-hydroxysuccinimidreagens, av hydroxylgrupper med CNBr, sulfonylklorid (tresyl klorid, tosylklorid), divinylsulfon, periodat (ger aldehydgrupper), tiolgrupper aktiveras med tiolreagens av typen SPDP etc.

Som exempel på ytor enligt uppfinningen kan nämnas:

Kolhydrat-R-X-Biosensoryta eller
Kolhydrat-R-X-Protein-Biosensoryta

där Kolhydrat, R och X exemplifierats ovan. X och protein kan vara direkt adsorberat på Biosensoryta ovan, men mellan X och Biosensoryta ovan samt mellan Protein och Biosensoryta ovan kan också finnas en kemisk grupp exempelvis en -CO-CH₂CH₂-S-grupp, dvs exempelvis:

Kolhydrat-R-NH-CO-CH₂CH₂-S-Biosensoryta eller
Kolhydrat-R-X-Protein-NH-CO-CH₂CH₂-S-Biosensoryta.

Som protein väljes exempelvis bovint serum albumin, men alla för applikationen lämpliga typer av proteiner kan användas i kolhydratderivatbaserad biosensor enligt uppfinningen.

Biosensorn enligt uppfinningen kan vara utformad i ett stort antal möjliga konfigurationer. Exempel härpå är:

- a) plan kolhydrat-yta som med lätthet kan kontaktas med provvätska, exempelvis en yta utformad som en sticka, varpå ytan kan placeras i mätinstrument för optisk reflektansmätning i luft.
 - b) flödessystem med provgenomflödescell vars ytor förenats med kolhydrat och där signalöverföring görs med optisk, elektrokemisk, termisk eller gravimetrisk mätmetod och där mätgivaren är placerad i eller nära anslutning till cellen.
 - c) mätbehållare, kyvettmodell, som förenats med signalöverförande givare med kolhydrat till vilken mätvätskan tillförs.
 - d) plan kolhydratyta som ytgörs av en del av signalöverföraren som med lätthet kan bringas i kontakt med provvätska under lämpligt tidsintervall, varefter provvätskan avlägsnas och signalöverförarytan karakteriseras med fysikalisk mätmetod, t.ex. elektronisk mätning, gravimetrisk mätning eller termisk mätning.
- I några situationer, t.ex. för att öka biosensorsignalen vid mätning av låga koncentrationer av celler, kan det vid mätning av analyt med biosensorn vara fördelaktigt att efter inbindning av analyt till kolhydratyten tillsätta mikropartiklar försedda med exempelvis kolhydrat som binder till den bundna cellen.

Ytan i biosensorn kan utgöras av exempelvis en guldyta eller en modifierad guldyta, plastyta som belagts med en guldyta, silveryta eller en annan metallyta eller modifieringar därav med polymerer till vilka kemisk koppling av kolhydrat kan ske.

Nedan ges icke-begränsande exempel på kolhydratyta som kan utnyttjas i biosensor enligt uppfinningen för inbindning och analys/bestämning av patogena urinvägsbakterier.

EXEMPEL

Ett exempel utfördes som följer: Kiselyta belagd med ett guldsikt modifierades med merkaptopropionsyra genom att nedsänka ytan i en 5 mM lösning av syran. Karboxylgrupperna modifierades med karbodiimid (EDC) under 2 timmar varpå digalaktosid med aglykon ($\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}\beta\text{-OEtSEtCONHNH}_2$), kopplades till den EDC-aktiverade ytan under 12 timmar vid pH 8.5 och ytan sköljdes därefter med buffert.

Den så med digalaktosid modifierade guldytan nedsänktes under 60 minuter (denna tid kan varieras) i ett prov med urinvägsinfektionsbakterier (s.k. p-fimbrierade E.coli) med $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ -specifikt receptorprotein, varefter ytan sköljdes med destillerat vatten i 2 minuter. En annan guldyta derivatiserad p.s.s. med $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ nedsänktes i ett prov innehållande en annan icke-infektionsframkallande E. coli stam som saknar $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ -specifikt receptorprotein. Inbindningsgraden av olika bakterier jämfördes mellan ytorna mha elektronmikroskop. Bakterien med $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ -receptor band in i ett 10-15 faldigt överskott jämfört med den andra bakterien.

Inbindningen av p-fimbrierade E.coli till en guldyta modifierad med enbart merkaptopropionsyra var ca 20 ggr lägre än till den $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ -modifierade ytan.

Alternative non-limiting examples are given below in which a neoglycoprotein was bound covalently or adsorbed directly on a surface for use in biosensor according to the invention.

In procedure B, $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}\beta\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-NHNH-BSA}$ was coupled to the same type of EDC-activated gold plate as in the procedure above. The Galabiose-BSA derivative (0.1 mg/ml) was dissolved in 0.1 M boronate, pH 8.5 and EDC-activated plates were immersed in this solution for 1 hour. Subsequently the plates were immersed in a BSA solution (3 mg/ml) in phosphate buffer for 1 minute and rinsed with buffer and distilled water and stored as above.

In procedure C, Gold plates (not pretreated with mercaptopropionic acid) were immersed in a solution of $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}\beta\text{-BSA}$ (0.1 mg/ml) in 0.1 M sodium phosphate, pH 6.0, for 1 hour and subsequently immersed in the above BSA solution (3 mg/ml) for 1 minute, rinsed with buffer and distilled water and stored as above.

These latter biosensor surfaces showed similar characteristics and low back-ground binding of bacteria as surface in the first example above.

PATENTKRAV

1. Biosensor, kännetecknad av att minst ett kolhydratderivat med förmåga att binda ett protein, ett virus eller en cell i ett prov är bunden till en yta i biosensorn.
2. Biosensor enligt krav 1 ovan, kännetecknad av att kolhydratderivatet är kemiskt bundet eller är bundet via adsorption till en yta som utgör en del av biosensorns signalöverföringsdel.
3. Biosensor enligt krav 1, där kolhydratderivatet kolhydratdel innehåller minst en komponent bestående av en hexosamin-, fukos-, galaktos-, glukos-, mannos, xylos-, N-acetyl-neuraminsyra-rest eller en analog därav.
4. Biosensor enligt krav 1, där kolhydratderivatets kolhydratdel innehåller minst en komponent bestående av en hexosamin-, fukos-, galaktos-, glukos-, mannos, xylos-, N-acetyl-neuraminsyra-rest eller en analog därav som derivatiserats i minst en av sina hydroxylgrupper eller aminogrupeer med en organisk eller inorganisk grupp.
5. Biosensor enligt något eller några av kraven ovan, där kolhydratderivatet innehåller minst en O-, N-, S-, eller C-glykosidiskt bunden aglykon.
6. Biosensor enligt något eller några av kraven ovan, där kolhydratderivatets aglykondel innehåller ett alifatiskt eller ett aromatiskt ämne.
7. Biosensor enligt något eller några av kraven ovan, där kolhydratderivatets aglykondel innehåller ett aminosyra-, peptid- eller proteinkomponent.
8. Biosensor enligt något eller några av kraven ovan, kännetecknad av att kolhydratderivatet utgörs av ett glykoprotein eller ett neoglykoprotein som är bundet kovalent eller via adsorption till en yta som utgör en del av biosensorns signalöverföringsdel.

9. Biosensor enligt krav 1, där biosensorn är en optisk biosensor som ger en signaländring vid inbindning av ett protein, ett virus eller en cell till en yta i biosensorn.
10. Biosensor enligt krav 9, där den optiska biosensorn utnyttjar ytplasmonstillståndsförändringar, ellipsometri, reflektansmätning eller polarisationsmätning.
11. Biosensor enligt krav 1, där biosensorn är baserad på en piezoelektrisk kristall, elektrokemisk elektrod eller en termistor.
12. Biosensor enligt krav 1, där kolhydraten är en oligosackarid eller ett derivat därav som bundits via en aglykon till en yta i biosensorn.
13. Biosensor enligt krav 1, där kolhydraten är en oligosackarid eller ett derivat därav som bundits via en guldyta till en guldyta i biosensorn.
14. Metod att binda ett kolhydrat eller ett derivat därav till en guldyta, karakteriserat av att ytan först täcks av en tiolförening som innehåller en organisk grupp som kan utnyttjas för kemisk bindning av ett kolhydrat eller ett derivat därav.
15. Guldyta modifierad med kolhydrat eller ett derivat därav.
16. Användning av biosensor enligt krav 1 för bestämning och eller analys av ett protein, ett virus, eller en cell.

9.

SAMMANFATTNING

Föreliggande uppfinning hänför sig till en biosensor i vilken en kolhydrat eller ett derivat därav används för att via specifik inbindning av ett protein, ett virus eller en cell generera en detekterbar signal.